

UNTERSUCHUNGEN
ÜBER DIE ARGINASEAKTIVITÄT
DES STRATUM CORNEUM
DER MENSCHLICHEN EPIDERMIS
UNTER NATIVEN BEDINGUNGEN
UND DIE AUSWIRKUNG
VON EXOGENEN EINFLÜSSEN

Klaus Geiger

1970

Dissertations- und Fotodruck Anneliese SCHUBERT
8 München 5 • Corneliusstraße 21 • Tel.: 268177



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552314_0027

Aus dem Institut für Medizinische Balneologie und Klimatologie
der Universität München

Vorstand: Prof. Dr.med. H. Drexel

Untersuchungen über die Arginaseaktivität des
Stratum corneum der menschlichen Epidermis
unter nativen Bedingungen und die Auswirkung
von exogenen Einflüssen

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der Zahnheilkunde
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München



vorgelegt von
Klaus Geiger
aus
Ehingen/Do

1978

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr.med. H. Drexel
Mitberichterstatter: Dipl.-Phys. K. Dirnagl
Dekan: Prof. Dr.med. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 14.3.1978



gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. Einleitung und Fragestellung	1
II. Das Enzym Arginase	3
1. Der Harnstoffzyklus	3
2. Arginase in der Literatur	5
III. Methodik	8
1. Allgemeines	8
2. Eine Methode zur in-vivo-Messung der Arginaseaktivität des Stratum corneum	9
a. Argininmessung	10
b. Harnstoffmessung	12
3. Eine Methode zur in-vitro-Messung der Arginaseaktivität des Stratum corneum	12
a. Materialgewinnung	12
b. Bestimmung der Arginaseaktivität auf Hautabdrücken	13
IV. Durchgeführte Versuche und Ergebnisse	14
1. Untersuchung zur Löslichkeit von Arginase	14
2. Untersuchung zur Arginasehemmung durch Zn^{2+} -Ionen	15
3. In-vivo-Messung der Arginaseaktivität des Stratum corneum	18
a. an der Hautoberfläche	18
b. am Stratum granulosum	23
4. Messung der Arginaseaktivität in-vitro	24
5. Auswirkung von Waschen der Keratinzellen auf die Arginaseaktivität	26

6. Auswirkung von Hauteluat auf die Aktivität gereinigter Hornzellen	29
7. Die Wirkung von Detergentien auf die Arginaseaktivität der Epidermis	31
8. Die Wirkung von UV-Licht auf die Arginaseaktivität von Keratinzellen	32
9. Die Wirkung von Harnstoff und Mg^{2+} -Ionen auf die Arginaseaktivität von Keratinzellen	34
a. Die Wirkung von Harnstoff	34
b. Die Wirkung von Mg^{2+} -Ionen	35
V. Diskussion	36
1. Zur Arginin- und Harnstoffbestimmung	36
2. Ergebnisse	37
a. In-vivo-Versuche	37
b. In-vitro-Versuche	38
3. Vergleich mit anderen Autoren	39
4. Allgemeines	40
VI. Zusammenfassung	43
VII. Literaturhinweise	44
VIII. Abbildungen	

I. Einleitung und Fragestellung

Während man früher die freien Aminosäuren der Hautoberfläche als Rückstand der Schweißproduktion betrachtet hat, sieht man sie heute vorwiegend als Produkte von Auf- und Abbauvorgängen während der Keratinisierung an.

In diesem Zusammenhang findet PRATZEL (17) in einer Untersuchung zur Wechselbeziehung wasserlöslicher Metaboliten in der Hornschicht Beziehungen zwischen den Aminosäuren Citrullin und Asparagin sowie zwischen Glutaminsäure, Asparaginsäure und Harnstoff. Diese Aminosäuren sprechen auffallenderweise Reaktionsfolgen des Harnstoffzyklus an.

VLACHOS (29) findet bei Untersuchungen zur Tiefenverteilung der freien Aminosäuren in menschlicher Hornschicht Glutaminsäure und Arginin im Stratum conjunctum im Verhältnis zu den anderen Aminosäuren in relativ höherer Konzentration. Wenn Glutaminsäure und Arginin im Laufe des Hornschichtenemporwachstums teilweise verschwinden, ist anzunehmen, daß es sich dabei um Umsetzungen des Harnstoffzyklus handelt.

In weiteren Untersuchungen stellt PRATZEL (17) eine Diskrepanz zwischen dem Bestand der Hornschicht an Harnstoff und der Nachschubrate aus der Granularschicht fest.

Während die Hornschicht einen reichlichen Gehalt an Harnstoff aufweist, ist die Nachschubrate aus der Granularschicht äußerst gering. Es ist also anzunehmen, daß Harnstoff erst im Stratum corneum gebildet wird. Wenn dies der Fall ist, so wäre das wiederum nur durch Umsetzungen des Harnstoffzyklus möglich.

BADER (2) untersuchte das Verhalten der freien Aminosäuren im Verlaufe einer Hydrotherapie. Dabei stellt sie Konzentrationsveränderungen der Aminosäuren Citrullin, Ornithin und des Harnstoffs vor und nach der Hydrotherapie fest.

Diese Aminosäuren weisen wiederum auf den Harnstoffzyklus hin. BADER (2) kommt dabei zu der Folgerung, daß die Haut auf den exogenen Reiz des Wassers mit Veränderungen der Enzymaktivität reagiert, möglicherweise durch Veränderungen in der Aktivität des Enzyms Arginase.

Durch die Tätigkeit dieses Enzyms wäre u.a. eine Konzentrationsänderung der an die Oberfläche der Haut transferierten Aminosäuren, sowie auch die Neubildung von Harnstoff im Stratum corneum zu erklären.

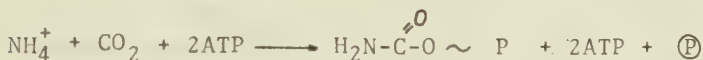
Im Rahmen dieser Arbeit sollten deshalb Untersuchungen über die Arginaseaktivität im Stratum corneum unter nativen Bedingungen vorgenommen werden, sowie exogene Einflüsse auf die Aktivität der Arginase im Stratum corneum der menschlichen Epidermis untersucht werden.

II. Das Enzym Arginase

1. Der Harnstoffzyklus

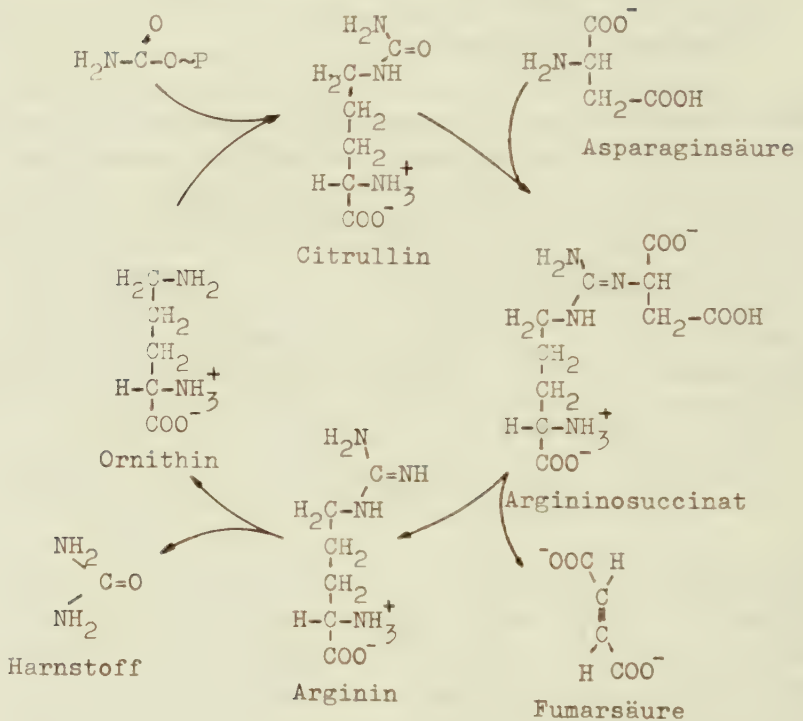
Der Harnstoffzyklus wurde von KREBS und HENSELEIT formuliert und beruhte ursprünglich auf der Beobachtung, daß Citrullin, Ornithin und Arginin in Anwesenheit von Ammoniak die Harnstoffbildung beschleunigen, ohne dabei selbst verbraucht zu werden.

Der Harnstoffzyklus dient der Stickstoffausscheidung in Form von Harnstoff. Das bei der Glutaminsäuredehydrierung entstehende NH_3 wird in Carbamylphosphat umgewandelt, nach der Gleichung



Carbamylphosphat reagiert mit Ornithin zum Citrullin und Citrullin wird in zwei Schritten in Arginin übergeführt. Zunächst tritt Asparaginsäure - sie liefert eine weitere NH_2 Gruppe - unter Verbrauch von einem Mol ATP mit Citrullin zur Argininobernsteinsäure zusammen. Dieses Zwischenprodukt wird in Arginin und Fumarsäure zerlegt. Das Arginin wird durch Arginase in Harnstoff und Ornithin gespalten. Der Harnstoff entsteht dabei in der tautomeren Form des Isoharnstoffs, welche sich spontan umlagert. Das Ornithin kann nun wieder Carbamylphosphat aufnehmen. Der Harnstoffzyklus ist ein energieverbrauchender Vorgang; 3 Mol ATP werden dabei benötigt (12).

DER HARNSTOFFZYKLUS NACH KARLSON



Obwohl man bisher noch keine Argininsynthetase und keine Ornithin-Transcarbamylase in der Haut gefunden hat (CROUNSE (7)), und es nicht geklärt ist, woher in der menschlichen Epidermis die für die Funktion des Harnstoffzyklus nötige Energie herrührt, nehmen einige Autoren das Vorkommen des Harnstoffzyklus in der Epidermis als gesichert an (STÜTTGEN (26), HERMANN (11)). Sie stützen sich vor allem auf die Tatsache, daß das für die Harnstoffbildung wichtige Enzym Arginase in der Epidermis nachgewiesen werden konnte.

2. Arginase in der Literatur

Arginase (L-Argininamidinohydrolase) ist ein Enzym, welches die Umwandlung von L-Arginin in Harnstoff und Ornithin katalysiert (s. Kapitel Harnstoffzyklus). Die Enzymeinheit von Arginase ist von van SLYKE und ARCHIBALD als die Menge definiert, die 1 μ Mol Arginin aus einer 0,285 Mol/l Argininsubstratlösung in einer Minute bei einem pH von 9,5 und einer Temperatur von 25°C abbaut (14).

Die Angaben über das Molekulargewicht schwanken in der Literatur zwischen 120 000 (30) und 138 000 (8). Nach Untersuchungen von REYERO und DORNER (20) handelt es sich um ein basisches Protein mit einem pH zwischen 9,25 und 9,35 und einer KM gegenüber L-Arginin von 2,7 - 3,1 m Mol/l. PENNINCKX (15) führte Untersuchungen über die Struktur von Arginase, die er aus einem Bakterium *Saccharomyces cerevisiae* gewann durch und stellte fest, daß sie aus drei Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von je 39 000 besteht.

Arginase ist ein sehr stabiles Enzym, welches bei 56°C noch 30 Min. lang aktiv ist. Bei Raumtemperatur übersteht es einige Tage, bei 4°C einige Wochen und bei -15°C 5 Monate ohne Aktivitätsverlust (14, 32).

Nach Untersuchungen von J. BOND (4) wird Arginase von einigen Aminosäuren gegen tryptische Inaktivierung geschützt. Besonders wirksam sollen in diesem Zusammenhang Cystein, Isoleucin, Leucin, Valin und Alanin sein.

Die Aktivität der Arginase ist pH abhängig. Eine maximale Aktivität erhält man bei einem pH von 9,5 - 9,8 (14, 23, 22). Weiterhin wird Arginase aktiviert durch Mn^{2+} (14, 23, 22) mit einem Optimum von 1 mM, sowie durch Co^{2+} (28) und angeblich auch durch Mg^{2+} (11).

Eine Hemmung von Arginase bewirken Zn^{2+} , Ag^+ , Hg^{2+} (19). Eine kompetitive Hemmung wird Lysin (19, 20) sowie, nach Untersuchungen von ROSENFELD (21), Adenosin, Inosin, Adenin und Harnsäure zugeschrieben.

Arginase wird neben ihrem Hauptvorkommen in der Leber, u. a. im Plasma (32), in Fibroblasten (8), in Lymphozyten und Granulozyten sowie in Erythrozyten vorgefunden. Hier ist sie bei perniziöser Anämie, Thalassämie und bei Neugeborenen erhöht. Bei chronischen Leberschäden ist sie erniedrigt (14, 32).

Bereits vor dreißig Jahren konnte Arginase von MARCCHIONINI (zitiert in 15) gelegentlich auch in Eruaten der Haut nachgewiesen werden. MARDASCHEW und SEMINA (zitiert in 15) untersuchten 1948 "Arginase in the Skin" und fanden, daß die Bildung von Harnstoff an das Vorhandensein von Arginase in den Zellen gebunden ist.

J. van SCOTT (24) stellte durch seine Untersuchungen fest, daß das Ferment vorwiegend in der Epidermis vorliegt. Er bestimmte das Verhältnis der Arginaseaktivität von Epidermis zu Corium als 25 : 1. Im Schweiß konnte van SCOTT trotz des hohen Harnstoffgehaltes keinerlei Arginaseaktivität feststellen. Erhöhte Arginaseaktivität fand er bei bestimmten Hautkrankheiten: Bei Psoriasis und bei Verrucae vulgares. Keine Erhöhung fand er bei Basaliomen und bei Pigmentzellnaevi.

ROTHBERG S. (22) stellte bei seinen Untersuchungen über die Arginaseaktivität der Epidermis ebenfalls eine erhöhte Aktivität von Psoriasissschuppen fest. Er machte dabei die Beobachtung, daß normale Epidermis die hohe Aktivität von Psoriasissschuppen hemmt. Weiterhin zeigte er, daß beim selben Individuum die Arginaseaktivität im Stratum corneum von Körperstelle zu Körperstelle verschieden sein kann: So ist sie an Hand- und Fußflächen sechs Mal höher als am Stamm.

In den Epithelien vom Oesophagus und Vagina findet er niedrigere Arginaseaktivitäten ebenso (in Übereinstimmung mit van SCOTT) in Basaliomen.

TERHEGGEN (27) fand 1974 in Papillomepithelien eine erhöhte Aktivität von Arginase vor. Die Papillome waren durch Inoculation mit dem Shope-Virus entstanden. Dabei entstammte die genetische Information für die Bildung der in den Papillomepithelien enthaltenen Arginase dem Virusgenom. Bei Patienten mit Hyperargininämie infolge Arginasedefekts, denen der Shope-Virus intravenös injiziert wurde, blieben allerdings die hohen Arginkonzentration im Serum unbeeinflusst, obwohl Tierversuche erfolgreich waren.

TSUJI (28) führte Untersuchungen über die Arginaseaktivität in der Haut verschiedener Mäusearten durch. Dabei untersuchte er die Beeinflussbarkeit der Arginaseaktivität durch Mn^{2+} -Ionen und Co^{2+} -Ionen. Er fand, daß sich die Arginase bei manchen Mäusearten durch Mn^{2+} aktivieren ließ, bei anderen aber nicht und schloß daraus, daß es in der Mäusohaut zwei verschiedene Arten von Arginase geben müsse, die sich durch ihre Aktivierbarkeit unterscheiden.

In diesem Zusammenhang ist auf Versuche von CABELLO hinzuweisen (zitiert bei 28), der in der menschlichen Leber zwei Arginasetypen feststellte, die sich in ihrem elektrophoretischen Verhalten unterscheiden.

Sämtliche vorstehende Autoren arbeiteten bei ihren Versuchen unter optimierten Versuchsbedingungen. Sie benutzten einen pH-Wert zwischen 9,5 und 9,8 und verwendeten $MnSO_4$ als Aktivator. Auch die Substratkonzentrationen waren sehr hoch (0.85 Mol/l Arg bei van SCOTT, 1.7 Mol/l Arg bei ROTHBERG, 0.2 Mol/l Arg bei TSUJI). Lediglich ROTHBERG wollte bei seinen Versuchen möglichst "native" Verhältnisse erreichen (s. S. 39).

III. Methodik

1. Allgemeines

Unter der Aktivität eines Enzyms versteht man die Geschwindigkeit der Reaktion, welche durch dieses Enzym katalysiert wird. Als Maß für die Menge und die Wirksamkeit eines Enzyms ist also der Stoffumsatz pro Zeiteinheit definiert. Für Enzymreaktionen benutzt man meist die Einheit Mikromol pro Minute (9).

Bei der Arginasereaktion gibt es nun zwei Möglichkeiten, die Aktivität zu messen:

- 1) Der Abbau von Arginin pro Zeiteinheit stellt ein Maß für die Arginaseaktivität dar.
- 2) Ebenso kann die Neubildung von Harnstoff pro Zeiteinheit als Maß für die Arginaseaktivität dienen.

Andere Autoren verwendeten alle die zweite Methode zur Bestimmung der Aktivität. Da sie als Substrat sehr hohe Konzentrationen (im Mol-Bereich) Arginin verwendeten, konnten sie einen Abbau von Arginin im Mikromolbereich nicht ausreichend genau messen.

Da in der vorliegenden Arbeit beabsichtigt war, den nativen Verhältnissen möglichst nahe zu kommen, wurde mit einer wesentlich niedrigeren Substratkonzentration gearbeitet. Als günstig erwiesen sich 200 $\mu\text{Mol/l}$ Arginin. Bei dieser Substratkonzentration konnte man bei der in den nächsten beiden Kapiteln beschriebenen Methode einen Abbau von Arginin gut beobachten.

2. Eine Methode zur in-vivo-Messung der Arginaseaktivität

Zunächst mußte ein Test zur Messung der Arginaseaktivität auf der menschlichen Hautoberfläche erarbeitet werden. Dabei stellt sich folgendes Problem:

Gibt man eine Argininlösung bekannter Konzentration auf die Haut und mißt man die Konzentrationsabnahme pro Zeiteinheit, so stellt man fest, daß die Argininkonzentration sehr schnell abnimmt. Dies zeigen einige Versuche, bei denen einer Versuchsperson jeweils 5 ml einer $200\mu\text{Mol/l}$ Argininlösung auf die Haut gegeben wurden. Die Konzentration der Lösung wurde in fünf Minuten Abständen gemessen (siehe Kapitel Argininmessung). Einer dieser Versuche sei in Abb. 1 dargestellt.

Die Abnahme der Argininkonzentration ist durch einen bloßen Abbau durch Arginase nicht zu erklären. Das Arginin diffundiert offensichtlich entlang des bestehenden Konzentrationsgefälles in die Haut; daneben wird sicherlich ein Teil des verschwundenen Arginins durch Arginase abgebaut. Um diesen Teil zu erfassen, wurde die Tatsache ausgenutzt, daß Arginase von Zn^{2+} -Ionen gehemmt wird.

Eine fast vollständige Hemmung erreicht man durch Verwendung von 0.3 mMol/l ZnSO_4 (s. Versuch IV,2 und Abb. 2 S. 51). Gibt man nun auf eine Hautstelle eine reine Argininlösung bekannter Konzentration, und auf eine unmittelbar benachbarte Hautstelle eine Lösung gleicher Konzentration und Menge, die aber noch zusätzlich ZnSO_4 enthält, so kommt der zu beobachtende Argininverlust in der ersten Lösung durch Permeation von Arginin und durch Arginaseaktivität zustande, in der zweiten Lösung ist nur die Permeation von Arginin wirksam, da hier die Arginase blockiert ist. Aus der Differenz der Konzentrationen pro Zeiteinheit erhält man nun die Arginaseaktivität.

Im einzelnen wurde folgendermaßen vorgegangen:

Zwei im Institut für Medizinische Balneologie und Klimatologie von PRATZEL entwickelte Meßkammern wurden an zwei unmittelbar benachbarten Stellen an der Beugeseite des Unterarms auf die Haut gepreßt (durch Beschwerung mit Gewichten von je 1 kg). Die Meßkammern lassen eine Benetzung einer Hautfläche von 3.14 cm^2 zu.

In die eine Kammer wurden 2 ml einer $200 \text{ } \mu\text{Mol/l}$ Argininlösung gebracht, in die Nachbarkammer 2 ml einer $200 \text{ } \mu\text{Mol/l}$ Argininlösung mit $0,3 \text{ mMol/l Zn}^{2+}$. Nach 20 Minuten wurden die Lösungen abpipettiert, sorgfältig filtriert und die Argininkonzentrationen gemessen. Da die Arginase des Stratum corneum nicht löslich ist, (s. ROTHBERG (22) und Versuch IV,1), ist die Reaktion mit dem Abpipettieren und dem Filtrieren beendet. Das Filtrieren dient dazu, arginaseaktive Keratinzellen zurückzuhalten.

Zur Kontrolle wurde bei manchen Versuchen die Änderung der Harnstoffkonzentration pro Zeiteinheit mitbestimmt.

Um möglichst natürliche Bedingungen zu erreichen wurde mit ungepufferten Lösungen gearbeitet; auch auf die Zugabe von Mn^{2+} -Ionen wurde verzichtet.

a) Argininbestimmung

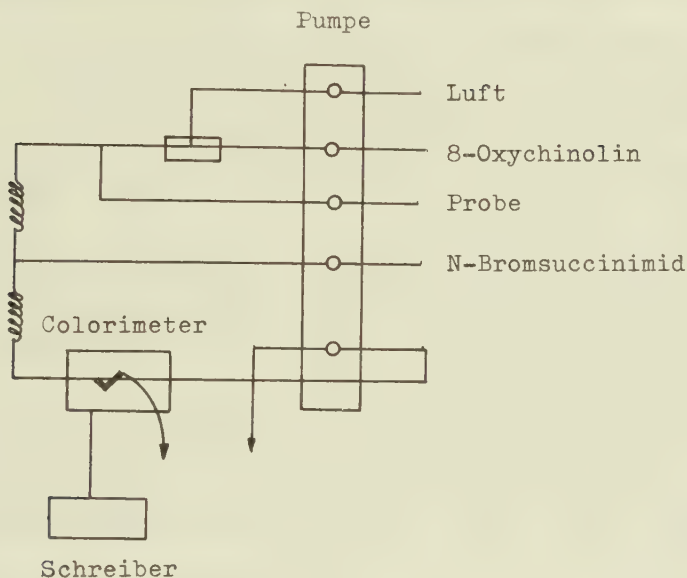
Bei der Argininbestimmung wurde ein Autoanalyzer der Firma Technicon verwendet. Das Arginin wurde dabei nach einer von BACCHUS (1) modifizierten Reaktion von SAKAGUCHI bestimmt.

Als Reagentien sind erforderlich:

eine 7 mMol/l -Lösung N-Bromsuccinimid

eine 2 mMol/l 8-Oxychinolin/Alkohol-Lösung, die 1 : 50 mit 20 % NaOH verdünnt und mit einem Detergens (0.1 ml ARW-7 auf 100 ml Oxychinolinlösung) versetzt wurde.

Fließdiagramm des Auto Analyzers:



Für die Analyse der Proben wurden diese mit einem automatischen Probengeber der Schlauchpumpe zugeführt. Die Pumpe der Firma Technicon bewirkt eine konstante Fließgeschwindigkeit in den Leitungen des Analysators. Der Flüssigkeitsstrom wird durch angesaugte Luftbläschen portioniert. Die Schlauchdurchmesser waren so bemessen, daß Probe, 8-Oxychinolin und N-Bromsuccinimid im Verhältnis 1 : 1 : 1 gemischt wurden. Das Reaktionsgemisch wird im Colorimeter automatisch in eine Küvette gesaugt und die Extinktion des entstandenen gelben Farbkomplexes bei 500 nm gemessen und vom Schreiber als Peak aufgezeichnet. Die kleinsten zu erfassenden Konzentrationen waren ca. 10 nMol/ml Arg. (Die Küvettenlänge betrug 50 mm)

b) Harnstoff-Bestimmung

Zur Harnstoffbestimmung wurde eine "Biochemica Test Combination Harnstoff" der Firma Boehringer Mannheim verwendet. Dieses Verfahren arbeitet nach der Urease-Methode:

Das durch Ureasespaltung aus dem Harnstoff gewonnene NH_3 ergibt mit einer Lösung aus 0,106 Mol/l Phenol und 0,17 mMol/l Na-Nitroprussid und einer Lösung aus 11 mMol/l Natriumhypochlorit und 0,125 Mol/l Natronlauge eine Farbreaktion. Deren Extinktion wird in einem Eppendorf-Photometer bei 546 nm gemessen und mit der Extinktion eines bekannten Standards verglichen.

Bei den eigenen Messungen wurde das Zehnfache der angegebenen Probemenge verwendet, um die zu erwartenden niedrigeren Harnstoffkonzentrationen erfassen zu können. Ammoniak wurde bei der Messung allerdings miterfaßt.

3. Eine Methode zur in-vitro-Messung der Arginase des Stratum corneum

a) Materialgewinnung

Zur Gewinnung von Hornschicht wurden an der Beugeseite der Unterarme Hautabrisse gemacht. Dabei wurde folgendermaßen vorgegangen:

Metallrähmchen, welche eine Fläche von $12,5 \text{ cm}^2$ (5 cm lang, 2,5 cm breit) freilassen, wurden mit Tesafilm der Firma Beiersdorf bespannt, auf der Hautoberfläche angebracht und danach abgerissen (Stripping-Methode nach SZAKALL (25)). Durch mehrfaches Abreißen erreicht man die Granularzellschicht, welche man an der hell glänzenden Oberfläche erkennt (hierzu sind ca. 15 Abrisse notwendig). Vor und nach dem Abriß wurden die bespannten Rähmchen auf einer Analysenwaage gewogen. Aus der Differenz der Gewichte erhält man das Nativgewicht der abgerissenen Hornsubstanzen.

b) Bestimmung der Arginaseaktivität auf Hautabrissen

Die Abrisse wurden vorsichtig von den Metallrähmchen abgezogen und in Reagenzgläser eingebracht. Dabei ist darauf zu achten, daß die Abrisse nicht verkleben. Anschließend wurden 10 ml einer 200 $\mu\text{Mol/l}$ Argininlösung zugegeben.

Da die Arginase in den Keratinzellen des Abrisses vorliegt, bedeutet dies den Start der Arginasereaktion.

Nach einem Schütteln von 20 Stunden wurden die Lösungen sorgfältig filtriert (Ende der Arginasereaktion) und deren noch vorhandene Argininkonzentration gemessen (s. Kap. Arginin-Bestimmung). Aus dem Abbau von Arginin pro Zeiteinheit kann man nun auf die Arginaseaktivität schließen. Aus den genannten Gründen wurde auch hier mit ungepufferten Lösungen ohne Zusatz von Mn^{2+} -Ionen bei einer Temperatur von 25°C gearbeitet.

Bei manchen Versuchen wurden die Streifen auch halbiert (Fläche 6.25 cm^2), dann wurden nur 5 ml einer 200 $\mu\text{Mol/l}$ Arg-Lösung als Substrat zugegeben.

IV. Durchgeführte Versuche und Ergebnisse

1. Untersuchung zur Löslichkeit von Arginase

Bei diesen Versuchen sollte untersucht werden, ob sich Arginase aus dem Stratum corneum herauslösen läßt, ob sich also in Eluaten Arginaseaktivität nachweisen läßt. Dazu wurden nach der oben beschriebenen Methode Hautabrisse an der Beugeseite des Unterarms gewonnen. Diese Abrisse wurden 10 Std. lang (bzw. 3 Std. lang) mit 5 ml 200 $\mu\text{Mol/l}$ Lösung Arginin eluiert. Die Eluate wurden filtriert, um arginaseaktive Hornzellen zurückzuhalten und 20 Std. lang bei 25°C inkubiert. Die Argininkonzentration der Eluate vor und nach der Inkubation wurde gemessen. Sollte sich die Arginase aus dem Hornmaterial herausgelöst haben, so wäre ein starker Abfall der Argininkonzentrationen während der Inkubation zu verzeichnen.

Versuchsperson 1

	Arg-Konz. des Eluats $\mu\text{Mol/l}$	Arg-Konz. des Eluats nach 20 Std. $\mu\text{Mol/l}$
Abriß 1	115.4	113.8
Abriß 2	116.9	110.8
Abriß 3	156.9	153.8

Elution 10 Stunden, Inkubation 20 Stunden

Versuchsperson 2

	Arg-Konz. des Eluats μMol/l	Arg-Konz. des Eluats nach 20 Std. μMol/l
Abriß 1	170.7	163.0
Abriß 2	181.5	175.3
Abriß 3	183.0	178.5
Abriß 4	190.7	186.1

Elution 3 Stunden, Inkubation 20 Stunden

Ergebnis:

Selbst nach 20-stündiger Inkubation ist kein nennenswerter Abfall der Argininkonzentration zu beobachten (zwischen 2 und 7 μMol/l/20 Std.). Die beobachteten minimalen Effekte sind möglicherweise auf leichte Verunreinigungen der Eluate zurückzuführen.

Auf Grund dieser Versuche muß man annehmen, daß Arginase fest an das Keratin des Stratum corneum gebunden ist.

Dieses Ergebnis deckt sich mit den Untersuchungen von ROTHBERG (22).

2. Untersuchung zur Arginasehemmung durch Zn^{2+} -Ionen

Für den in Kapitel III,2 beschriebenen Arginasetest auf der Hautoberfläche ist es unerlässlich, den hemmenden Einfluß von Zn^{2+} -Ionen auf die Arginaseaktivität zu untersuchen. Insbesondere sollte festgestellt werden, bei welcher ZnSO_4 Konzentration eine maximale Arginasehemmung erreicht ist.

Dazu wurden wiederum bei einer Versuchsperson an der Beugeseite der Arme nach der beschriebenen Methode Abrisse

hergestellt. Diese Abrisse wurden genau in der Mitte durchtrennt. Man kann nun davon ausgehen, daß beide Hälften des gleichen Abrisses auch die gleichen Arginaseaktivitäten besitzen. Die eine Hälfte der Abrisse wurde nun mit einem Argininsubstrat von 200 $\mu\text{Mol/l}$ und steigenden ZnSO_4 Konzentrationen (0,025 - 0,4 mMol/l ZnSO_4) inkubiert, die andere (Vergleichs)-Hälfte wurde mit einer reinen 200 $\mu\text{Mol/l}$ Argininlösung als Substrat 22 Std. lang inkubiert. Am Ende der Inkubationszeit gibt der Argininabbau pro Zeiteinheit auf der Vergleichshälfte die ungehemmte Arginaseaktivität an. Der Argininabbau pro Zeiteinheit wird durch die zugehörige andere Abrißhälfte, bei der das Substrat mit ZnSO_4 versetzt wurde - eine Zn^{2+} -Hemmung vorausgesetzt - entsprechend geringer sein. Aus der Differenz der beiden Aktivitäten kann man die prozentuale Hemmung berechnen.

Untersuchung der Arginasehemmung mit Zn^{2+} -Ionen (s. Abb. 2)

Material: Hautabrisse Fläche 6,25 cm^2

Substrat: 200 $\mu\text{Mol Arg}$, 5 ml

Temperatur: 25°C

Argininabbau bei
25°C in 20 Std.
durch Keratinzel-
len in $\mu\text{Mol/l}$ Arg

Versuch	Substrat ohne Zn^{2+}	Substrat mit Zn^{2+}	Verwendete ZnSO_4 Konzentration mMol	Hemmung in %
1	92,6	60,5	0,025	34,6
2	91,3	49,7	0,05	45
3	67,2	21,5	0,1	68
4	78,2	33,1	0,2	57,6
5	61	31,8	0,025	47,8
6	62,3	34,5	0,05	44,8
7	75,5	31,3	0,1	51,1
8	100,7	9,3	0,3	90,8
9	100	4,0	0,4	96

Substrat: 172,2 $\mu\text{Mol/l}$ Arg, Dauer: 72 Std. Temperatur:
25°C Material: einzelne Hornschuppen

10	105,02	1,4	0,3	98,7
----	--------	-----	-----	------

Man sieht, daß schon geringe Mengen Zn^{2+} (0,025 mMol) ge-
nügen, um ein Drittel der Arginaseaktivität zu hemmen. Ein
Maximum an Hemmung ist bei einer Konzentration von 0,3 -
0,4 mM ZnSO_4 erreicht. Die gewählte ZnSO_4 Konzentration
zur Arginasehemmung bei den durchgeführten in-vivo-Versu-
chen war 0,3 mM ZnSO_4 .

3. In-vivo-Messung der Arginaseaktivität des Stratum corneum

a) an der Hautoberfläche

Bei der Messung der in-vivo Aktivität der Arginase wurde wie in Kapitel III,2 beschrieben, verfahren. Dabei wurde bei einer Versuchsperson in verschiedenen Versuchsfolgen an ein und denselben Stellen der Hautoberfläche die Aktivität bis zu fünf Mal unmittelbar hintereinander gemessen. Insgesamt wurden acht Versuchsfolgen durchgeführt. Bei den Versuchsfolgen I, II und III wurden auch die Änderungen der Harnstoffkonzentration pro Zeiteinheit bestimmt. Die Versuche seien hier tabellarisch dargestellt.

Bei allen Versuchen: Substrat 200 $\mu\text{Mol/l}$ Arg bzw. 200 $\mu\text{Mol/l}$ Arg/O,3 mM Zn^{2+}

Testansatz: 2 ml

Fläche: 3,14 cm^2

Inkubationsdauer: 20 Minuten

Versuchsfolge I (s. Abb. 3)

Messung der Aktivität durch Bestimmung des Argininabbaus an der Oberfläche des Stratum corneum

Arg-Konz. ($\mu\text{Mol/l}$) nach 20 Min				
Versuch	gehemmt	ungehemmt	Argininabbau ($\mu\text{Mol/l}$)	Aktivität mU/cm^2
1	210,7	180,1	30,6	0,9
2	210,3	174,1	36,2	1,1
3	206,8	170,9	35,9	1,11
4	211,5	171,9	39,6	1,26

Messung der Aktivität durch Bestimmung der Harnstoffbildung im selben Ansatz

Versuch	Harnstoff-Konz. ($\mu\text{Mol/l}$) nach 20 Min.		Harnstoff- bildung (μMol)	Aktivität mU/cm^2
	gehemmt	ungehemmt		
1	43	100	57	1,8
2	46	96	50	1,5
3	30	70	40	1,2
4	0,0	24	24	0,8

Versuchsfolge II

Messung durch Bestimmung des Argininabbaus an der Oberfläche des Stratum corneum

Versuch	Arg-Konz. ($\mu\text{Mol/l}$) nach 20 Min.		Argininabbau ($\mu\text{Mol/l}$)	Aktivität (mU/cm^2)
	gehemmt	ungehemmt		
1	178,6	150,7	27,9	0,8
2	193,4	147,5	45,9	1,46

Messung durch Bestimmung der Harnstoffbildung im selben Ansatz

Versuch	Harnst.-Konz. nach 20 Min. ($\mu\text{Mol/l}$)		Harnstoffbil- dung ($\mu\text{Mol/l}$)	Aktivität (mU/cm^2)
	gehemmt	ungehemmt		
1	212	245	33	1,05
2	133	149	16	0,50

Versuchsfolge III

Messung durch Bestimmung des Argininabbaus

	Arg.-Konz. nach 20 Min. ($\mu\text{Mol/l}$)		Argininabbau ($\mu\text{Mol/l}$)	Aktivität (mU/cm^2)
Versuch	gehemmt	ungehemmt		
1	198,6	174,1	24,5	0,78
2	186,3	160,5	25,8	0,82

Messung durch Bestimmung der Harnstoffbildung im selben Ansatz

	Harnst.-Konz. nach 20 Min. ($\mu\text{Mol/l}$)		Harnstoffbil- dung ($\mu\text{Mol/l}$)	Aktivität (mU/cm^2)
Versuch	gehemmt	ungehemmt		
1	19,9	74,5	54,6	1,73
2	19,9	52,5	32,6	1,03

Die Versuchsfolgen I, II und III dienten dazu, zu zeigen, daß ein Argininabbau im selben Ansatz einen Anstieg des Harnstoffs bedingt. Somit ist gezeigt, daß in diesem Verfahren zur Messung der Arginaseaktivität auf dem Stratum corneum in-vivo, tatsächlich die Aktivität des Enzyms erfaßt wird.

Bei den weiteren Versuchen wurde deshalb auf die Kontrolle durch die Harnstoffmessung verzichtet.

Versuchsfolge IV

Versuch	Arg-Konz. nach 20 Min ($\mu\text{Mol/l}$)		Argininabbau $\mu\text{Mol/l}$	Aktivität (mU/cm^2)
	gehemmt	ungehemmt		
1	182,9	171,4	11,5	0,36
2	180,0	160,0	20	0,63
3	200	164,3	35,7	1,13

Versuchsfolge V

Versuch	Arg-Konz. nach 20 Min ($\mu\text{Mol/l}$)		Argininabbau $\mu\text{Mol/l}$	Aktivität (mU/cm^2)
	gehemmt	ungehemmt		
1	160,8	160,5	0,3	0,095
2	188,5	155,7	32,8	1,04
3	177,5	157,7	19,8	0,63
4	178,5	151,4	27,1	0,86

Versuchsfolge VI

Versuch	Arg-Konz. nach 20 Min ($\mu\text{Mol/l}$)		Argininabbau $\mu\text{Mol/l}$	Aktivität (mU/cm^2)
	gehemmt	ungehemmt		
1	165,6	137,5	28,1	0,89
2	163	133,8	29,2	0,93
3	159,7	142,6	17,1	0,54
4	167,1	120,3	46,8	1,49

Versuchsfolge VII

	Arg-Konz. nach 20 Min. ($\mu\text{Mol/l}$)		Argininabbau ($\mu\text{Mol/l}$)	Aktivität (mU/cm^2)
Versuch	gehemmt	ungehemmt		
1	147,4	136,8	10,6	0,34
2	145,6	131,5	14,1	0,45
3	161,4	129,8	31,6	1,01
4	150,4	120,3	30,1	0,96
5	168,1	113,2	54,9	1,74

Versuchsfolge VIII

	Arg-Konz. nach 20 Min. ($\mu\text{Mol/l}$)		Argininabbau ($\mu\text{Mol/l}$)	Aktivität (mU/cm^2)
Versuch	gehemmt	ungehemmt		
1	157,6	127,2	30,4	0,97
2	168,2	139,4	28,8	0,92
3	163,6	148,5	15,1	0,48
4	180,6	143,2	37,4	1,19

Nach diesen Versuchen beträgt die Aktivität der Arginase an der Hautoberfläche etwa 1 mU/cm^2 (Standardabweichung $\sigma = 0,34 \text{ mU/cm}^2$).

Auch aus diesen Versuchen wird deutlich, daß die Arginase an unlösliche Träger gebunden sein muß, denn auch nach fünf aufeinanderfolgenden Messungen an derselben Hautstelle (das bedeutet eine Elutionsdauer von 5 mal 20 Min) ist kein Nachlassen der Aktivität zu beobachten.

b) am Stratum granulosum

Bei den folgenden Versuchen sollte die Arginaseaktivität an der Hornschichtoberfläche mit der Aktivität am freigelegten Stratum granulosum verglichen werden.

Es wurde folgendermaßen vorgegangen:

Nachdem die Aktivität an der Oberfläche gemessen war, wurde das Stratum granulosum durch Tesafilmabrisse freigelegt. Die Messung wurde nun am Stratum granulosum wiederholt.

Ergebnisse:Versuchsperson 1

Arginaseaktivität an der Hornschichtoberfläche: 0,82
mU/cm²

Arginaseaktivität am Stratum granulosum
Versuch 1: 95,5 µU/cm²
Versuch 2: 162,4 µU/cm²

Versuchsperson 2

Arginaseaktivität an der Hornschichtoberfläche: 1,2 mU/cm²
Arginaseaktivität am Stratum granulosum
Versuch: 0,4 mU/cm²

Es ist ersichtlich, daß die Arginaseaktivität am Stratum granulosum bedeutend niedriger ist, als an der Hornschichtoberfläche. Bei der Versuchsperson 1 war fast keine Aktivität mehr nachweisbar.

In diesem Zusammenhang sind die Untersuchungen von PRATZEL (17) zu erwähnen, die besagen, daß am Stratum granulosum keine Harnstoffbildung stattfindet. Offensichtlich liegt hier die Arginase in stark gehemmter Form vor.

4. Messung der Arginaseaktivität in vitro

Die Materialgewinnung und Messung der Aktivität wurde wie in Kapitel III,3 durchgeführt.

Versuchsreihe I:

Die gesamte Epidermis bis hin zum Stratum granulosum wurde mittels Tesastreifen abgerissen.

Dazu waren 12 Abrisse notwendig. Aufeinanderfolgende sehr leichte Abrisse wurden zusammengefaßt, um etwa gleiche Gewichte zu erhalten. Auf diese Weise erhielt man sieben Abrißgruppen. Die Aktivität der auf den Abrissen enthaltenen Arginase wurde gemessen und in Beziehung zum Gewicht der Abrisse gesetzt:

Versuchsperson 1:

Abriß- gruppe	Gewicht (g)	Arg-Abbau ($\mu\text{Mol/l}$)	Arg-Abbau/mg ($\mu\text{Mol/l}$)	Aktivität (mU/mg)
1	0,0022	11,1	5,04	0,042
2	0,00183	29	15,84	0,13
3	0,00162	48,3	29,8	0,25
4	0,00305	75,9	24,8	0,20
5	0,00295	62,1	21,05	0,18
6	0,00184	78,7	42,77	0,36
7	0,00154	86,9	56,42	0,47

Versuchsreihe II

Die Aktivitätsbestimmung von Hautabrissen wurde wiederholt:

Versuchsperson 2:

Abriß	Gewicht (g)	Arg-Abbau ($\mu\text{Mol/l}$)	Arg-Abbau/mg $\mu\text{Mol/l}$	Aktivität (mU/mg)
1	0,00098	92,9	94,8	0,79
2	0,00060	119,7	199,5	1,66
3	0,00056	123,7	220,8	1,84
4	0,00063	117,7	186,8	1,55
5	0,00060	144,4	240,6	2,00
6	0,00071	146,6	206,4	1,71

Da die Tiefenverteilung der Arginase nicht untersucht werden sollte, wurde hier kein Wert auf das Erreichen des Stratum granulosum gelegt.

Bei der Versuchsperson 1 wurden an einem anderen Tag wiederum Abrisse der Hornhaut gemacht und deren Aktivität gemessen.

Versuchsreihe III

Abriß	Aktivität (mU/mg)	Abriß	Aktivität (mU/mg)
1	1,06	7	0,77
2	1,40	8	1,26
3	1,34	9	0,78
4	1,32	10	1,01
5	1,35	11	1,14
6	0,94		

Die Arginaseaktivität scheint bei allen drei Versuchsreihen in den tieferen Schichten des Stratum corneum höher zu sein als in den oberflächlichen Schichten.

Durchschnittliche Arginaseaktivität
in Versuchsreihe I:

0,23 mU/mg Hornsubstanz
Standardabweichung:
 $\sigma = 0,14$ mU/mg

Durchschnittliche Arginaseaktivität
in Versuchsreihe II:

1,59 mU/mg Hornsubstanz
Standardabweichung:
 $\sigma = 0,42$

Durchschnittliche Arginaseaktivität
in Versuchsreihe III:

1,12 mU/mg Hornsubstanz
Standardabweichung:
 $\sigma = 0,22$

Während die durchschnittlichen Arginaseaktivitäten pro mg Abriß in der Abrißgruppe II und III etwa gleich groß sind, wurde in der Versuchsreihe I eine niedrigere Arginaseaktivität gemessen. Möglicherweise liegt das an exogenen Einflüssen, denen die VP ausgesetzt war, und welche hier eventuell zu einer stärkeren Hemmung oder Zerstörung von Arginase führten. Solche Einflüsse sollen in den nächsten Kapiteln untersucht werden.

5. Auswirkung von Waschen der Keratinzellen auf die Arginaseaktivität

Die Abrisse von Versuchsreihe I des vorhergehenden Kapitels wurden ein zweites Mal gemessen. Mit der ersten Messung war zwangsläufig mit der Inkubation, welche ja aus einem 20-stündigem Schütteln in der Substratlösung bestand, ein Spülen der Keratinzellen verbunden. Danach wurden die Abrisse noch ein drittes Mal gemessen.

Aktivität mU/mg Hornsubstanz

Abrißgruppe	unbespült	nach dem 1. Spülen	nach dem 2. Spülen	Aktivitäts- steigerung nach dem 2. Spülen mU/mg
1	0,042	0,09	0,36	0,32
2	0,13	0,19	0,44	0,31
3	0,25	0,33	0,67	0,42
4	0,20	0,20	0,33	0,13
5	0,18	0,17	0,34	0,16
6	0,36	0,38	0,62	0,26
7	0,47	0,43	0,67	0,20

Auch die Abrisse der Versuchsreihe II des vorhergehenden Kapitels wurden nach der vorangegangenen "Waschung" erneut gemessen.

Aktivität mU/mg Hornsubstanz

Abriß	unbespült	bespült	Aktivitätssteigerung mU/mg
1	0,79	1,00	0,21
2	1,66	1,83	0,17
3	1,84	1,86	0,02
4	1,55	1,88	0,33
5	2,00	2,25	0,25
6	1,77	1,81	0,04

Mit den Abrissen der Versuchsreihe III des vorhergehenden Kapitels wurde genauso verfahren.

Aktivität mU/mg			
Abriß	bespült	unbespült	Aktivitätssteigerung mU/mg
1	1,06	1,25	0,19
2	1,40	1,64	0,24
3	1,34	1,55	0,21
4	1,32	1,55	0,23
5	1,35	1,52	0,17
6	0,94	1,13	0,19
7	0,77	1,25	0,48
8	1,26	1,59	0,33
9	0,78	0,88	0,10
10	1,01	1,23	0,22
11	1,14	1,52	0,38

Ergebnis:

Durch das Bspülen von Keratinzellen auf Tesafilmaabrissen nimmt die Aktivität der Arginase auf allen 24 untersuchten Abrissen zu.

Bei Versuchsreihe I um durchschnittlich 0,26 mU/mg Hornsubstanz $\sigma = 0,09$ mU/mg

Bei Versuchsreihe II um durchschnittlich 0,17 mU/mg Hornsubstanz $\sigma = 0,11$ mU/mg

Bei Versuchsreihe III um durchschnittlich 0,25 mU/mg Hornsubstanz $\sigma = 0,10$ mU/mg

Somit kann bei einer gefundenen durchschnittlichen Aktivität aller 24 Abrisse (Versuchsreihen I, II und III) von 0,98 mU/mg und einer durchschnittlichen Aktivitätssteigerung von 0,23 mU/mg, angenommen werden, daß die im Stratum corneum vorhandene Arginase zu 23 % gehemmt vorliegt.

Offensichtlich wird durch das Bespülen ein löslicher Arginasehemmer aus den Keratinzellen eluiert.

6. Auswirkung von Hauteluat auf die Aktivität gereinigter Hornzellen

Nachdem sich gezeigt hat, daß die Arginaseaktivität von Hornschichtmaterial durch Bespülen zunimmt, stellt sich die Frage nach der Ursache dieser Aktivitätssteigerung. Sollte in der Epidermis tatsächlich ein löslicher Inhibitor vorhanden sein, so muß dieser auch nachzuweisen sein. Um diesen Nachweis zu erbringen, wurde folgendermaßen vorgegangen:

Zunächst wurden zehn etwa 15 cm lange und 2,5 cm breite Hautabrisse an der Beugeseite des Unterarms gewonnen. Diese wurden in 2 cm lange Stücke zerschnitten und in einem Erlenmeyerkolben drei Stunden lang mit 50 ml H₂O eluiert. Das Eluat, das nun den gelösten Inhibitor enthalten müßte, wurde sorgfältig filtriert, um arginaseaktive Hornschuppen zurückzuhalten.

Mit dem Eluat wurde nun eine Argininlösung der Konzentration 200 nM/ml hergestellt.

Mittels der bekannten Methode der Materialgewinnung (Kap. III, 3a) wurden am anderen Arm Abrisse hergestellt. Diese wurden halbiert und beide Hälften 2 Std. lang mit aqua bidest. gespült. Durch dieses Bespülen erreicht man, wie im vorherigen Kapitel gezeigt, eine Aktivitätssteigerung.

Die Aktivität der gereinigten Keratinzellen auf diesen Abrissen wurde nun in der Weise gemessen, daß die eine Hälfte eines Abrisses als Substrat normale 200 µMol/l Argininlösung zugesetzt erhielt, die zugehörige andere Hälfte erhielt als Substrat die 200 µMol/l Argininlösung, die nach dem oben beschriebenen Verfahren aus Hauteluat hergestellt

wurde. In dieser Substratlösung ist nun auch der Inhibitor enthalten.

Der Versuch wurde bei zwei Versuchspersonen durchgeführt.

Das Ergebnis sei hier dargestellt:

Versuchsperson 1

Argininabbau bei 24°C in 20 Std. durch
Keratinzellen in $\mu\text{Mol}/\text{cm}^2$ Arginin

Versuch	Substrat ohne Hauteluat	Substrat mit Hauteluat	Hemmung %
1	27,44	25,64	6,53
2	25,89	21,89	15,45
3	24,42	24,42	0
4	27,08	24,37	10

Versuchsperson 2

Argininabbau bei 24°C in 20 Std. durch
Keratinzellen in $\mu\text{Mol}/\text{cm}^2$ Arginin

Versuch	Substrat ohne Hauteluat	Substrat mit Hauteluat	Hemmung %
1	13,25	11,69	11,7
2	15,14	12,08	20,4
3	16,77	13,89	17,17
4	17,18	14,83	13,68

Aus diesen Versuchen erkennt man, daß im gewonnenen Eluat tatsächlich ein Arginasehemmer enthalten war. Die durchschnittliche Hemmung bei der Versuchsperson 1 betrug 8 %, bei der Versuchsperson 2 15 %.

Bemerkenswert bei diesen Versuchen ist auch die Tatsache, daß bei der Versuchsperson 1 der Argininabbau ($25 \mu\text{Mol}/$

cm²/20 Std.) fast doppelt so stark war wie bei der Versuchsperson 2 (15 uMol/cm²/20 Std.); entsprechend konnte auch fast doppelt so viel Inhibitor eluiert werden.

Diese Versuche zusammen mit den Versuchen des Kapitels IV,5 machen deutlich, daß die aktuelle Aktivität der Arginase im Stratum corneum der menschlichen Epidermis weniger von der tatsächlichen Arginasemenge, als vielmehr von der jeweiligen "Hemmstellung" des Enzyms abhängt.

7. Die Wirkung von Detergentien auf die Arginaseaktivität der Epidermis

Stoffe, mit denen die menschliche Haut täglich in Berührung kommt, sind Waschmittel, Badezusätze und Seifen. Der Einfluß dieser Stoffe auf die Arginaseaktivität der Epidermis sollte untersucht werden.

Dazu wurde verwendet:

als Waschmittel: Dodecylbenzolsulfonat	1 % Lösung
Persil	1 % Lösung
Calgon	1 % Lösung
als Badezusatz: Litamin	1 % Lösung
als Seife: Palmolive	1 % Lösung

An verschiedenen Stellen des rechten Arms wurden wie bisher Abrisse genommen. Diese wurden in der Mitte durchtrennt. Eine Hälfte diente wiederum als Vergleichswert, die andere Hälfte wurde zwei Stunden lang in die oben genannten Detergentien gelegt und danach gespült.

Durch die meisten verwendeten Detergentien erhält man eine Abnahme der Arginaseaktivität, die offensichtlich auf einer Zerstörung des Enzyms beruht.

	Zerstörung in % gegenüber dem Vergleichswert
Litamin	40,8
Dodecylbenzolsulfonat	85,5
Persil	12,04
Palmolive	45,1

Eine Ausnahme bildete das Wasserenthärtungsmittel Calgon. Bei ihm kam es zu einer Aktivitätssteigerung um das Doppelte.

Die Konzentration von 1 % Lösungen im vorherigen Versuch entspricht sicher nicht den Konzentrationsverhältnissen, wie man sie beim Waschen auf der Haut vorfindet. Deshalb wurde dieser Versuch unter Verwendung von 0,1 % Lösungen wiederholt. Diese 0,1 % Lösungen sollen etwa den im Haushalt verwendeten Konzentrationen entsprechen (16).

Aber auch diese Lösungen führen zu einer Zerstörung des Enzyms. Die Aktivität gegenüber den Vergleichswerten war zwischen 12 % und 27 % erniedrigt. Lediglich Calgon bewirkte auch hier eine Zunahme der Aktivität von 1,3 % (s. Abb. 5).

8. Die Wirkung von UV-Licht auf die Arginaseaktivität von Keratinzellen

Zur Untersuchung der Wirkung von UV-Licht auf die Arginaseaktivität von Hornschichtmaterialien wurden in der bekannten Weise Abrisse hergestellt. Diese Abrisse (5 cm lang, 2,5 cm breit) wurden wiederum halbiert. Die eine Hälfte der Abrisse wurde unter eine UV-Lampe (Hg-Niederdruckbrenner) gelegt und aus einem Abstand von einem Meter drei Stunden lang bestrahlt. Die Temperatur der Abrisse

erreichte dabei 31°C. Die zugehörigen anderen Abrißhälften - sie dienten der Vergleichsmessung - wurden dunkel bei der gleichen Temperatur aufbewahrt.

Der Versuch wurde mit zwölf verschiedenen Abrissen durchgeführt.

Arg-Abbau in 20 Std. durch Keratin-
zellen aus einer 200 $\mu\text{Mol/l}$ Arg-Lösung
in $\mu\text{Mol/l}$

Abriß	UV-Exposition	unbelichtet	Aktivitätsverlust in %
1	37,3	82,1	55
2	52,2	101,5	49
3	58,2	83,6	30
4	54,1	102,3	47
5	60,2	115,8	48
6	57,2	103,8	45
7	60,0	93,9	36
8	63,1	113,9	45,6
9	54,7	89,1	38
10	62,6	96,2	35
11	62,6	105,4	41
12	61,5	123,1	50

Die Versuche 1-6 und 7-12 wurden an verschiedenen Tagen durchgeführt.

Die Versuche zeigen, daß durch UV-Exposition der gewählten Zeitdauer ein Aktivitätsverlust von 43 % Standardabweichung $\sigma = 7,0$ % entsteht. Diese Erscheinung ist nur durch Zerstörung der Arginase durch UV-Licht zu erklären.

9. Die Wirkung von Harnstoff und Mg^{2+} -Ionen auf die Arginaseaktivität von Keratinzellen

a) Die Wirkung von Harnstoff

Um zu erfahren, ob Harnstoff im Sinne einer Produkthemmung (Harnstoff ist ein Reaktionsprodukt der von Arginase katalysierten Reaktion) auf die Arginaseaktivität rückwirkt, wurde die Wirkung von verschiedenen Harnstoffkonzentrationen auf die Arginaseaktivität von Keratinzellen untersucht.

Die Materialgewinnung erfolgte in der schon mehrfach beschriebenen Weise (s. Kap. IV,2; IV,7; IV,8).

Das Substrat wurde mit verschiedenen Harnstoffkonzentrationen (s. Tabelle) versetzt. Bei der Vergleichsmessung bestand das Substrat wiederum aus einer reinen 200 $\mu\text{Mol/l}$ Argininlösung. Die Inkubationszeit betrug, wie bei allen Versuchen 20 Std. bei 24°C . Es wurden gespülte aktivierte Abrisse verwendet.

Argininabbau in $\mu\text{Mol}/20 \text{ h/cm}^2$ bei 24°C

Versuch	Substrat ohne Harnstoff	Substrat mit Harnstoff	Harnstoffkon- zentrationen $\mu\text{Mol/l}$
VP 1: 1	16,11	16,00	0,5
2	18,53	18,29	100
3	18,29	19,50	40
VP 2: 4	24,00	23,23	100
5	24,66	24,89	40
6	25,60	24,59	20

In der Hornschicht wäre eine Konzentration von 20 nMol/cm^2 zu erwarten. Wie man aus der Tabelle sieht, beeinflußt Harnstoff die Arginaseaktivität von Hornzellen nicht.

b) Die Wirkung von Mg^{2+} -Ionen

Während manche Autoren (11) eine aktivierende Wirkung von Mg^{2+} -Ionen auf die Arginase beschreiben, bestreiten andere jede Aktivierung von Arginase durch dieses Ion (4).

Aus diesem Grund wurde auch die Wirkung von MgCl_2 auf die Arginaseaktivität von Keratinzellen untersucht. Die Versuche wurden in der gleichen Weise wie die vorhergehenden (Abschnitt a) durchgeführt.

Argininabbau in $\mu\text{Mol}/20 \text{ Std}/\text{Abriß}$

Versuch	Substrat ohne Mg^{2+}	Substrat mit Mg^{2+}	Mg^{2+} -Konzentration (mMol/l)
1	97,3	81,4	0,1
2	103,4	71,7	0,2
3	81,4	60,0	0,3

Wie man aus diesem Versuch ersieht, bewirken Mg^{2+} -Ionen keine Arginaseaktivierung, im Gegenteil, man erhält eine leichte Hemmung.

V. Diskussion

1. Zur Arginin- und Harnstoffbestimmung

Zur Beurteilung der Argininbestimmung in verschiedenen Proben wurde jeweils zwischen zwei Proben eine Kalibrierungsmessung mit 200 nMol/ml einer Argininlösung durchgeführt. Es wurden nur solche Messungen ausgewertet, bei denen die Abweichungen zwischen zwei aufeinanderfolgenden Kalibrierungspeaks geringer als 5 % waren. Die Streuung innerhalb einer Serie betrug während eines ununterbrochenen Laufs des Autoanalyzers von 2,5 Stunden bei 200 nMol/ml Arginin $\sigma = \pm 0,26$ nMol/ml.

In diesem Zusammenhang muß darauf hingewiesen werden, daß sich die als Substrat verwendeten Argininlösungen als sehr stabil erwiesen haben. Argininlösungen mit einer Konzentration von 200 nMol/ml, die nicht mit arginaseaktiven Verunreinigungen behaftet waren, überstanden ein 24-stündiges Schütteln bei 25°C ohne jeden Konzentrationsverlust. Man erhält deshalb bei den angewandten Methoden keine Artefakte durch eventuellen spontanen Zerfall von Arginin bei den gewählten Temperaturen und Inkubationszeiten.

Die bei den in-vivo-Versuchen beigegebenen ZnSO_4 -Konzentrationen stören die Argininmessung nicht. Erst bei ZnSO_4 -Konzentrationen, die größer als 0,5 mMol/l sind, kommt es zu Meßungenauigkeiten infolge einer leichten Unterdrückung der Farbstoffbildung bei der Argininmessung.

Für die Bestimmung von 3 mg/100 ml Harnstoff ergab sich innerhalb der Versuchsserie ein Fehler von $\sigma = \pm 0,109$ mg/100 ml.

2. Ergebnisse

a.) in-vivo-Versuche

Die Messung der Arginaseaktivität direkt auf der Hautoberfläche wurde durch die Tatsache erschwert, daß das Substrat Arginin je nach dem Grade des bestehenden Konzentrationsgefälles mehr oder weniger stark in die Haut diffundiert. Durch die Verwendung eines Inhibitors in Form von Zn^{2+} -Ionen konnte aber die Permeation des Substrats vom Abbau durch Arginaseaktivität unterschieden werden. Die Messungen wurden an ein und derselben Stelle der Hautoberfläche mehrmals in unmittelbarer Folge durchgeführt. Dabei wurde eine Arginaseaktivität von etwa 1 mU/cm^2 vorgefunden ($\sigma = \pm 0,34 \text{ mU/cm}^2$).

Auffällig ist, daß die auf der Hautoberfläche gemessene Aktivität innerhalb der Versuchsfolgen von Versuch zu Versuch leicht zunimmt. Bei allen durchgeführten in-vivo-Versuchen ist die gefundene Aktivität bei den ersten Messungen geringer als bei den folgenden. Der Grund ist darin zu sehen, daß bei der mit der Messung zwangsläufig verbundenen Elution hemmende Substanzen aus der Haut eluiert werden, während das Enzym selbst an unlösliche Träger gebunden bleibt. Die Versuche des Kapitels IV,5 haben diesen Befund bestätigt.

Am Stratum granulosum ist fast keine Arginaseaktivität mehr vorhanden (vorgefundene Aktivität: $0,2 \text{ mU/cm}^2$). Ein Teil der vorgefundenen Aktivität rührt sicherlich von Meßfehlern her. So besteht die Möglichkeit, daß beim Freilegen des Stratum granulosum kleine Keratininseln trotz sorgfältigem Abreißen übrig bleiben. Andererseits tritt bei zu heftigem Abreißen möglicherweise Serum aus. Die Arginaseaktivität dieser Bestandteile wird dann mitgemessen.

Das Ergebnis ist in Übereinstimmung mit PRATZEL, der Untersuchungen darüber anstellte, welche Schichten der Epidermis an der Bildung von Harnstoff beteiligt sind:

PRATZEL eluierte von der Hautoberfläche $246 \text{ nMol/cm}^2/30 \text{ min}$ Harnstoff bei einem Nachschub von $1,07 \text{ nMol/cm}^2/\text{min}$. Die Elution an der Granularschicht ergab, daß praktisch überhaupt kein Harnstoff nachgeliefert wird. Diesen Widerspruch erklärt er damit, daß der Harnstoff erst in der Hornschicht entstanden sein muß.

b.) in-vitro-Versuche

Die Aktivität von Hornmaterial der Epidermis, welches durch Tesafilmabrisse gewonnen wurde, betrug im Durchschnitt $0,98 \text{ mU/mg}$ (siehe Tabellen S. 24-25). Wie diese Tabellen zeigen, scheint die Arginaseaktivität zur Hautoberfläche hin abzunehmen. Dies mag auf eine Zerstörung durch äußere Einflüsse hindeuten. An einer solchen Zerstörung sind möglicherweise, wie in den Versuchen IV,7 und IV,8 gezeigt, Waschmittel und UV-Licht beteiligt.

Interessant ist die Tatsache, daß ein bloßes Bespülen von Hautabrissen mit Wasser zu einer sehr deutlichen Zunahme der Arginaseaktivität führt (genaue Werte siehe Tabellen S. 27-28). Dies läßt den Schluß zu, daß offensichtlich ein wasserlöslicher Inhibitor in der Epidermis enthalten ist. So konnte durch den Versuch IV,6 nachgewiesen werden, daß Hauteluat tatsächlich zu einer Abnahme der Arginaseaktivität gereinigter Hornzellen führt.

3. Vergleich mit anderen Autoren

S. ROTHBERG (22) bestimmte die Arginaseaktivität von Epidermispulver und Hornschichtschabselmaterial. Er fand unter optimierten Bedingungen ($\text{pH} = 9,5$; 37°C ; $0,05 \text{ Mol/l Mn}^{2+}$) eine Aktivität von durchschnittlich 590 mU/mg Hornmaterial. Unter natürlichen Bedingungen (ohne Verwendung von Mn^{2+}) fand er eine Aktivität von durchschnittlich 52 mU/mg Hornmaterial. Die Werte liegen also ca. fünfzig Mal höher als in vorliegender Arbeit. Hierzu ist folgendes zu sagen:

ROTHBERG arbeitete mit sorgfältig gereinigten und dehydrierten Hornpartikeln. Durch diese Art der Materialaufbereitung entfernte er die eluierbaren Inhibitoren. Die ROTHBERGschen Gewichtsangaben beziehen sich auf das Trockengewicht der Hornsubstanz. Weiterhin machte ROTHBERG die Beobachtung, daß Hornpartikel eine um so größere Arginaseaktivität pro Gewichtseinheit besitzen, je kleiner sie sind. Um möglichst hohe Aktivitäten zu erreichen, verwendete er bei seinen Versuchen nur Hornpartikel, die eine gewisse Größe nicht überschritten. - Bei der Messung der Arginaseaktivität verzichtete er zwar auf die Zugabe von Mn^{2+} -Ionen, verwendete aber den bei der Arginasereaktion optimalen pH von $9,8$ bei einer Substratkonzentration von $0,17 \text{ Mol/l}$ Arginin. Alle diese Maßnahmen wirken im Sinne einer Aktivierung auf das Enzym ein.

Demgegenüber wurde in vorliegender Arbeit das durch Tesa-filmabrisse gewonnene Hornmaterial keiner weiteren Aufbereitung unterzogen. Die Aktivität wurde so gemessen wie sie auf den Abrissen vorlag. Es wurde auch keine Auswahl besonders aktiver Hornschuppen vorgenommen. Die Gewichtsangaben beziehen sich auf das Nativgewicht der Haut. Bei der Messung der Arginaseaktivität wurde auf die Zugabe von Mn^{2+} -Ionen - in Übereinstimmung mit den ROTHBERGschen Ver-

suchen - verzichtet, die Substratkonzentration betrug aber nur 200 nMol/ml Arginin.

Diese Unterschiede in der Materialaufbereitung und in der Aktivitätsmessung erklären vielleicht die höheren Werte von ROTHBERG.

Zu den in-vivo-Versuchen sind keine Vergleichswerte anderer Autoren vorhanden.

4. Allgemeines

Obwohl Harnstoff einer der wesentlichen Bestandteile des Schweißes ist, wurde Arginase im Schweiß bisher nicht nachgewiesen. Da auch Arginin maßgeblich über den Schweiß ausgeschieden wird (6), sollte man annehmen können, daß trotz der unter nativen Bedingungen geringen Arginaseaktivität, Harnstoff zumindest teilweise erst durch den Kontakt des Schweißes mit der Hornschicht entsteht.

Bei einer mittleren Schweißrate von etwa $0,02 \text{ l/cm}^2/\text{min}$ ($0,5 - 1 \text{ l/24 Std.}$ nach GEIGY-Tabelle) mit einem angenommenen Harnstoffgehalt von $0,2 \text{ g/l}$ ($0,03 - 2,0 \text{ g/l}$ nach GEIGY-Tabelle) ergibt sich eine notwendige Produktionsrate für Harnstoff von $0,06 \text{ nMol/cm}^2/\text{min}$, wozu eine Arginaseaktivität von $0,06 \text{ mU/cm}^2$ erforderlich ist. Die Arginaseaktivität der Hautoberfläche von 1 mU/cm^2 reicht damit zur Harnstoff-Produktion in jeder angegebenen Schweißflußrate und jeder vorkommenden Harnstoffkonzentration aus.

Daß die gefundenen Werte für die Arginaseaktivität auch bei der gleichen Versuchsperson an verschiedenen Tagen verschieden groß sein können, hängt ganz offensichtlich von exogenen Faktoren ab, denen die Person ausgesetzt ist. So wird durch bloßes Bespülen eine Aktivitätszunahme erreicht. Der Einfluß von Detergentien und UV-Strahlung be-

wirkt einen Aktivitätsrückgang. Dies läßt, wie schon erwähnt, den Schluß zu, daß die momentane Aktivität des Enzyms vor allem von der Summe der aktivierenden und hemmenden Einflüsse, also von seiner Hemmstellung abhängig ist und weniger von der tatsächlichen "Konzentration" des Enzyms.

Die Arginase der Hornschicht wird ebenso wie die Arginase in Epidermispulver (ROTHBERG) durch einen Inhibitor gehemmt, der sich - im Gegensatz zum Enzym - als wasserlöslich erwiesen hat. Im Rahmen dieser Arbeit bleibt jedoch die Natur der Substanz, die an dieser natürlichen Enzymhemmung beteiligt ist, unbekannt. Auszuschließen als Inhibitor ist das Reaktionsprodukt Harnstoff. Interessant ist die Tatsache, daß der in dieser Arbeit bei der in-vivo-Messung verwendete Inhibitor Zink ebenfalls in der Hornschicht vorkommt. VOORHEES (30) u.a. (1969) fanden etwa 28 ppm Zink in der Hornschicht, entsprechend 0,4 Mol/g, womit die Hornschichtkonzentration etwa mit der in dieser Arbeit verwendeten Konzentration für vollständige Enzymhemmung von 0,3 mMol/l übereinstimmt. Wenn dieses Zink wasserlöslich vorliegen würde, wäre damit allein eine ausreichende Erklärung für die Inaktivierung der Arginase gegeben. Andererseits findet VOORHEES für Psoriasis-Schuppen 51 ppm Zink, obwohl ROTHBERG für Psoriasis eine erhöhte Arginaseaktivität und weniger Inhibitor angibt, was mit Angaben von BRAUN-FALCO (5) u.a., die kein Zink in der Psoriasis Epidermis finden, übereinstimmt.

Da auch Wasch- und Hautreinigungsmittel eine Enzymhemmung bewirken, ist es denkbar, daß auch Waschmittelreste an der diskutierten Hemmfunktion beteiligt sind. Allerdings scheint es sich bei den Waschmitteln um eine irreversible Reaktion, eventuell durch Zerstörung des Enzyms, zu handeln. Genauso verhält es sich mit der durch UV-Bestrahlung bewirkten Verminderung der Aktivität.

Der Gebrauch von Hautreinigungsmitteln (Badezusätzen) führt offensichtlich neben einer Arginasehemmung über längere Zeit zu einem durchschnittlich geringeren Harnstoffgehalt der Hornschicht. PRATZEL (18) stellte dies auf Grund einer Befragungsstudie über den Gebrauch und Nichtgebrauch von Badezusätzen an 156 Personen fest. Der Harnstoffgehalt der Epidermis von Menschen, die keine Badezusätze verwenden ($n = 93$), beträgt im Verhältnis zu Glycin das 1,13fache (Mol/Mol) und unterscheidet sich mit $p = 0,008$ significant von den Menschen, die Badezusätze verwenden ($n = 63$) mit 0,68 Mol/Mol (Glycin wird hier als Bezugsgröße verwendet, da es die geringsten Streuungen aufweist. Es ist ein Mittelwert von 16,6 Mol % anzunehmen).

Verschiedene Autoren (WOHLRAB 1974 (31), HELLGREN und LARSEN (10), 1975) geben an, daß der Harnstoff über die Hautoberfläche rückresorbiert wird. Dabei soll der Harnstoff die Mitoserate der Basalis hemmen und zu einem Rückgang der Hornschichtdicke führen. Demnach ist zu vermuten, daß Spülungen der Hautoberfläche entweder durch die Beeinflussung der Arginaseaktivität oder durch Harnstoff-Extraktion das Wachstum der Epidermis stimulieren. Ein experimenteller Beweis steht dafür allerdings noch aus.

Vielleicht bringt dieser Gedanke einen Beitrag zur Erklärung, weshalb häufiges übertriebenes Baden und Duschen, verbunden mit dem Gebrauch von Syndets und Seifen zu deutlichen Hautschäden führt.

VI. Zusammenfassung

1. Nach der Erarbeitung einer Meßmethode wurde die Aktivität von L-Arginase an der Oberfläche der Epidermis und am Stratum granulosum gemessen. Die Aktivität an der Oberfläche der Unterarme beträgt ungefähr 1 mU/cm^2 . Die Aktivität am Stratum granulosum ist deutlich vermindert bzw. fast nicht mehr nachweisbar. - Bei der in-vivo-Messung der Hornschicht-Arginase konnte durch Zn^{2+} -Hemmung die Permeation des Substrats erfaßt werden.
2. Es wurde die Arginaseaktivität von Hornhautabrissen unter nativen Bedingungen gemessen. Die Aktivität betrug dabei durchschnittlich $0,98 \text{ mU/mg}$. Die Aktivität des Enzyms nahm zur Oberfläche hin ab.
3. Es wurden verschiedene exogene Einflüsse auf die Arginaseaktivität von Keratin untersucht:
 - a) Bespülen von Keratinzellen mit H_2O ergab dabei eine durchschnittliche Aktivitätszunahme um 23 %. Daraus wurde geschlossen, daß Arginase in der Epidermis in gehemmter Form vorliegt.
 - b) Inkubation mit Detergentien ergibt eine Aktivitätsabnahme je nach Konzentration und Art der Detergentien zwischen 15 und 85 % im Sinne einer Zerstörung des Enzyms.
 - c) UV-Exposition ergibt eine Aktivitätsverminderung von 43 %.
 - d) Inkubation mit Harnstoff ergibt keine Auswirkung auf die Arginaseaktivität von Hornmaterial.
 - e) Mg^{2+} -Ionen bewirken keine Aktivierung der Hornschicht-Arginase.
4. In der Epidermis konnte ein wasserlöslicher Inhibitor nachgewiesen werden. Aussagen über dessen Natur bleiben weiteren Experimenten vorbehalten.

VII. Literaturhinweise

1. Bacchus, R.,
London, D.: The measurement of arginine in
Plasma
Clin. Chim. Acta, 33, 479-482
(1971)
2. Bader, G.: Untersuchungen über die freien
Aminosäuren der menschlichen
Hornschicht im Verlaufe einer Hy-
drotherapie
Dissertation, Uni-München 1975
3. Birnkammer, F.: Harnstoff und Citrullin in der
Hornschicht gesunder menschlicher
Haut
Dissertation, München 1971
4. Bond, J.: Effect of manganese and amino
acids on proteolytic inactivation
of beef liver arginase
Biochim. et Biophys. Acta 327,
157-165 (1973)
5. Braun-Falco, O.,
Rathjens, B.: Histochemische Untersuchungen
über das Verhalten von Zink in
der Haut bei Psoriasis und ande-
ren Hauterkrankungen
Derm. Wschr. 134, 837 (1956)
6. Coltmann: The Amino Acid Content of Sweat
in Normal Adults
American Journal of Clinical Nu-
trition 18, 373-378 (1966)
7. Crounse, Rothberg: Evaluation of the Enzyms of the
Krebs Henseleit urea circle in
human epidermis
J. invest. Derm. 36, 287 (1961)

8. Elsen van, A.,
Leroy, J.: Arginase Isoenzymes in Human
Diploid Fibroblasts
Biochim. and Biophys. Research Communications 62,
191 (1975)
9. Grimmer, G.: Biochemie
Hochschultaschenbücher-Verlag 1969
10. Hellgren, L.,
Larsson, K.: On the Effect of Urea on Human Epidermis
Dermatologica 149, 289-293
(1974)
11. Hermann, F., Ippen, H.,
Schaefer, H.,
Stüttgen, G.: Biochemie der Haut
Georg Thieme 1973
12. Karlson, P.: Kurzes Lehrbuch der Biochemie
Georg Thieme 1970 7. Auflage
13. Nakamura, N.,
Fujita, M., Kimura, K.: Purifikation and Properties
of L-Arginase from *Bacillus subtilis*
Agr. Biol. Chem. 37, 2827
(1973)
14. Nishibe, H., Makino, H.: Automated Determination of
Arginase in Human Erythrocytes
Anal. Bioch. 43, 357-364
(1971)
15. Penninckx, M.,
Simon, J., Wiame, J.: Interaction between Arginase
and L-Ornithine Carbamoyltransferase in *Saccharomyces cerevisiae*
Eur. L. Bioch. 49, 429-442
(1974)

16. Pflieger, H.: Zur Wirkung von Detergentien auf Hornzellen
Diss., München 1970
17. Pratzel, H.: Biochemische Vorgänge an der menschlichen Hautoberfläche
Diss., TH-München 1969
18. Pratzel, H.: Verteilungsmuster der freien Aminosäuren der Hornschicht von hautgesunden Personengruppen aufgeteilt nach verschiedenen Merkmalen
Hornschicht-Symposium der Dermatolog. Kliniken Berlin 1976 Im Druck
19. Rauen, M.H.: Biochemisches Taschenbuch
Springer Verlag 1964
20. Reyero, C., Dorner, F.: Purification of Arginase from Human Leukemic Lymphocytes and Granulocytes
Eur. J. Biochem. 56, 137-147 (1975)
21. Rosenfeld, J., Dutta, S., Cheda, G., Tritsch, G.: Purine and Pyrimidine Inhibitors of Arginase
Biochem. et Biophys. Acta 410, 146-166 (1975)
22. Rothberg, S., Scott van, E.: Evaluation of Arginase Activity in normal epidermal Tissue and pathological Stratum corneum
Journ. of Inv. Derm. 31, 263-268 (1958)

23. Scott van, E.J.: Arginase activity in human skin
Science 113, 3943 (1948)
24. Scott van, E.J.: Studies on the arginase activity
of the skin
J. invest. Derm. 17, 21 (1951)
25. Stüpel, H., Die Wirkung von Waschmitteln auf
Szakall, A.: die Haut
Hütting Verlag, Heidelberg
(1957)
26. Stüttgen, G., Funktionelle Dermatologie
Schaefer, H.: Springer Verlag
27. Terheggen, H., Unsuccessfull Trial of Gene Re-
Lowenthal, A., placement in Arginase Deficiency
Colombo, J., Kinderheilkunde 119, 1-3 (1975)
Rogers, S.:
28. Tsuji, S., Tsuda, I., Arginase Activity in the Skin of
Ohkouchi, E.: Normal and Mutant Mice with He-
reditary Hairlessness
Wakayama Med. Rept. 14, 101-106
(1971)
29. Vlachos, G.: Zur Verteilung der freien Amino-
säuren in der menschlichen Horn-
schicht
Diss. Univ. München 1970
30. Voorhees, I., u.a.: Arch. Derm. 100 (1969) 669
Zitiert nach Stüttgen, Schaefer
Funktionelle Dermatologie,
Springer Verlag
31. Wohlrab, W.: Die DNS-Synthese in der Epider-
mis nach Kontakt mit Harnstoff
Dermatologica 146, 144-148
(1974)

32. Zapf, W.:

A Semi Automated Method for
Plasma Arginase

Clin. Chim. Acta 26, 547-554
(1969)

VIII. Abbildungen

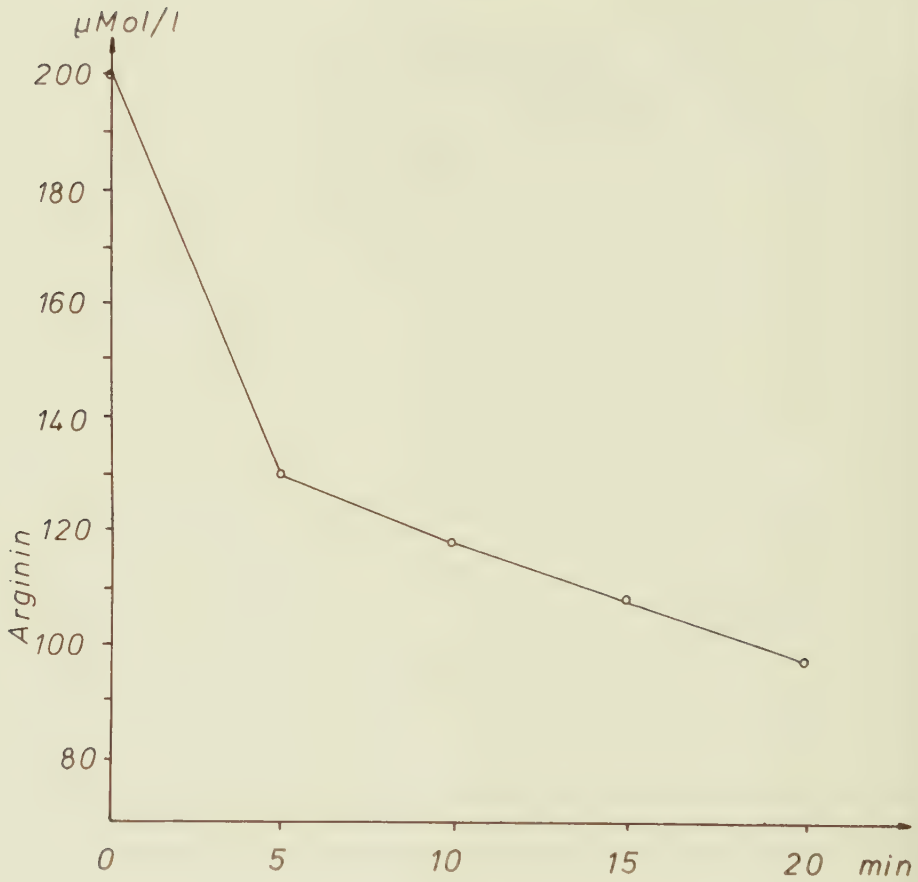


Abb. 1

ABNAHME DER ARGININKONZENTRATION AUF
DER HAUTOBERFLÄCHE IN 20 MIN.

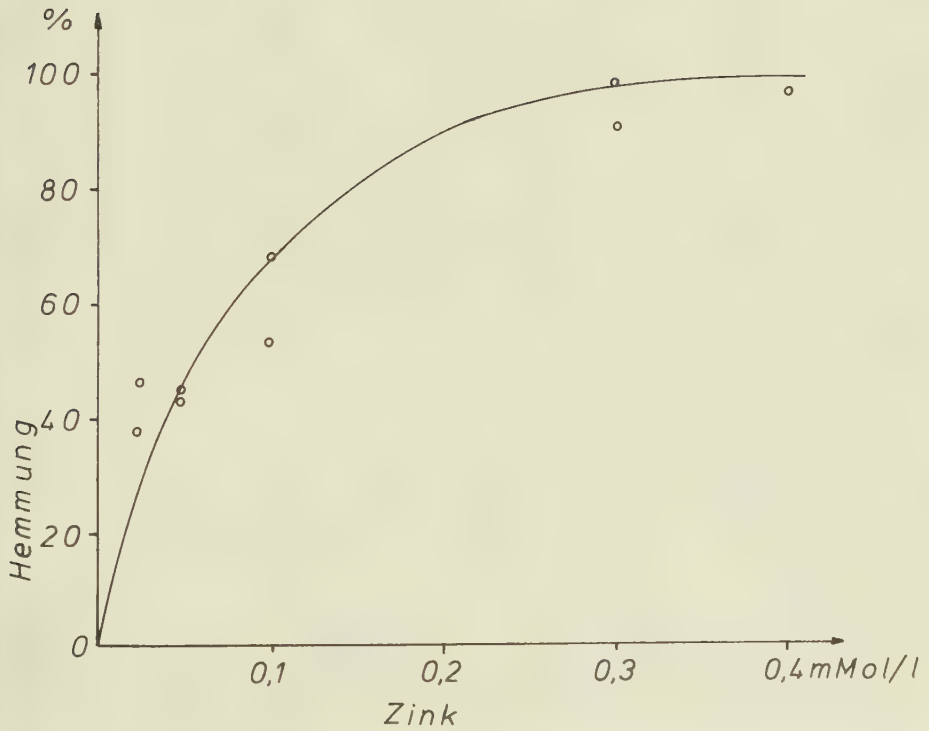
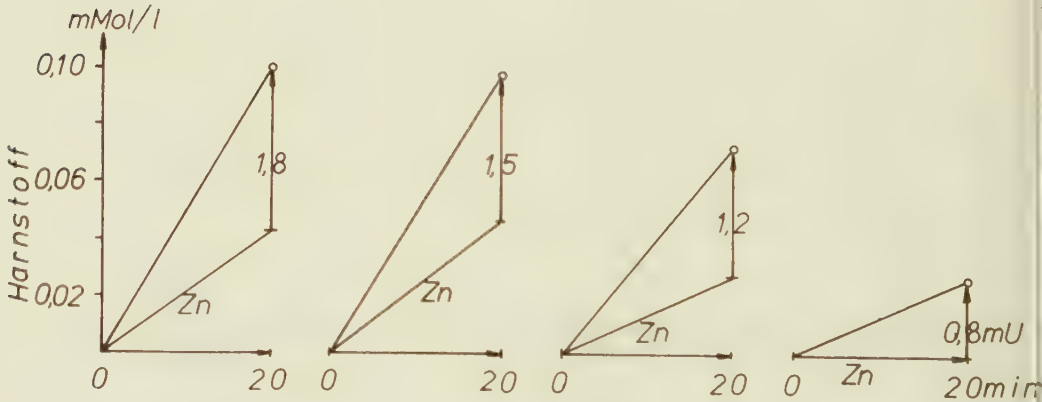
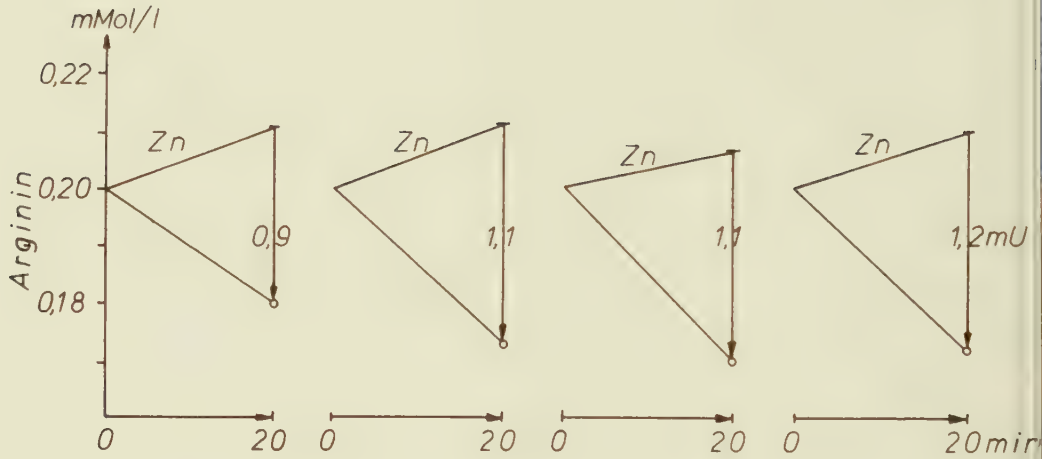


Abb. 2

HEMMUNG DER ARGINASEAKTIVITÄT VON
HORNZELLEN DURCH Zn^{2+}



Fläche 3,14 cm²; Volumen 2 ml

• Permeation + Enzymaktivität

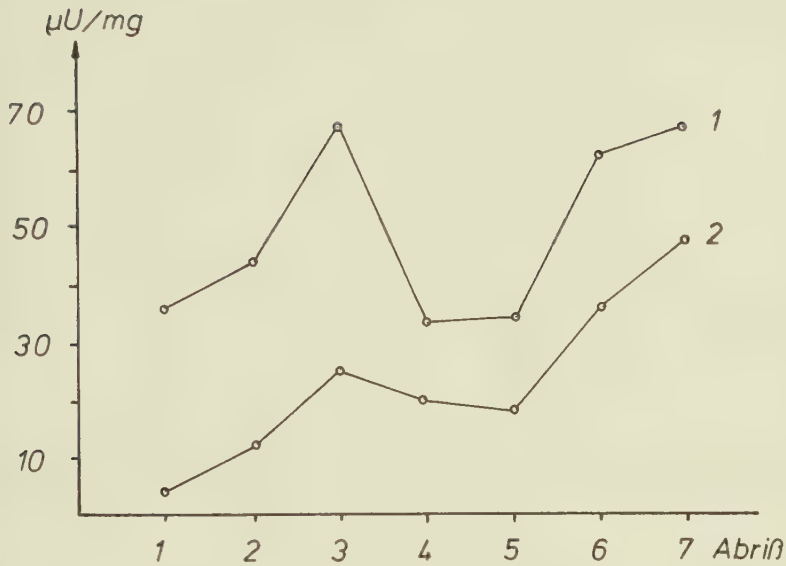
- nur Permeation (Inhibitor: 0,3 mMol/l Zn²⁺)

Aktivität ca. 1 mU/cm²

Abb. 3

ARGINASEAKTIVITÄTSBESTIMMUNG AN DER HAUTOBERFLÄCHE

(4 aufeinanderfolgende Messungen auf gleicher Fläche)



2 ... vor dem Bespülen
 1 ... nach dem Bespülen

Abb. 4

ARGINASEAKTIVITÄT UNGEREINIGTER UND GEREINIGTER
 KERATINZELLEN IN VERSCHIEDENEN TIEFEN DES STRA-
 TUM CORNEUM

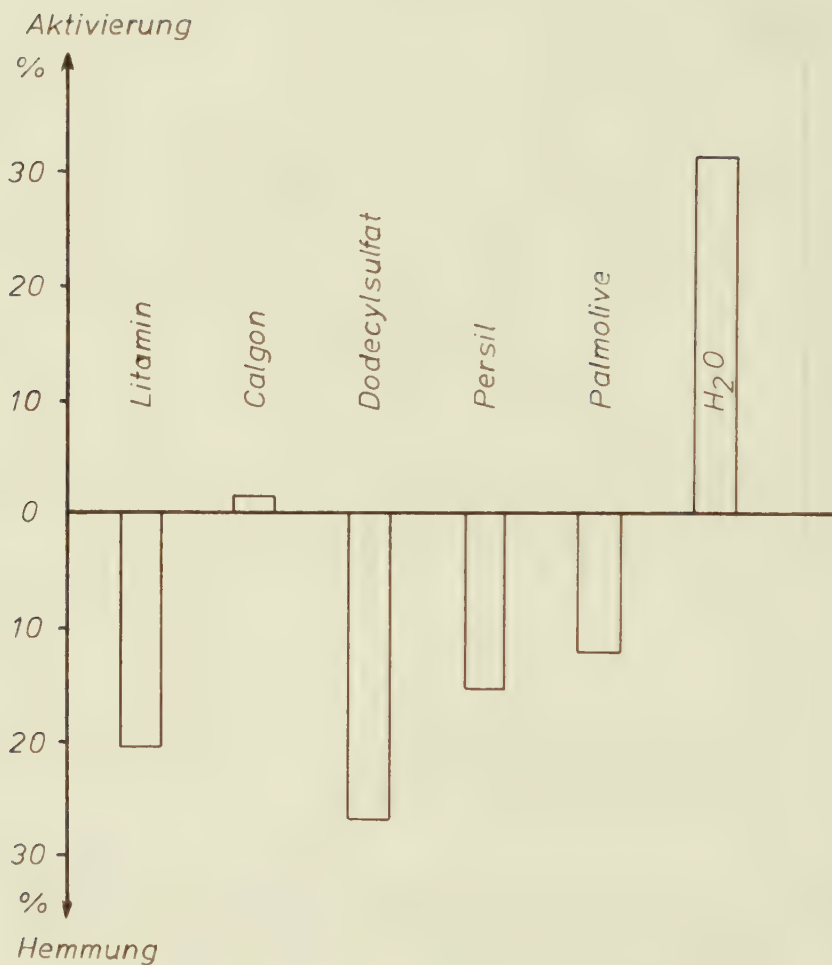


Abb. 5

ÄNDERUNG DER ARGINASEAKTIVITÄT VON HORN-
ZELLEN DURCH INKUBATION MIT VERSCHIEDENEN
WASCHMITTELN IN 0,1% -LÖSUNG

Am Schluß möchte ich Herrn Prof. Dr.med. H. Drexel und Herrn Dipl.-Phys. K. Dirnagl für die Überlassung des Themas danken.

Mein Dank gilt auch allen Mitarbeitern des Instituts für Medizinische Balneologie und Klimatologie, insbesondere Herrn Dr.rer.nat. H. Pratzel, der mir bei allen auftauchenden Problemen mit Rat und Tat und vor allem mit viel Geduld zur Seite stand.

Lebenslauf

Ich wurde am 8.12.1946 in Ehingen/Do. als Sohn des Wolfgang Geiger und seiner Ehefrau Antonie geboren.

Von 1952 bis 1957 besuchte ich die Volksschule in Ehingen/Do., ab 1957 das Gymnasium Ehingen/Do., die Oberrealschule Füssen/Lech, die Realschule Trostberg und das Ludwig-Thoma-Gymnasium Prien/Chiemsee, wo ich 1968 das Abitur ablegte.

Im Wintersemester 1968/69 begann ich an der Universität Marburg/Lahn mit dem Studium der Zahnheilkunde. Nach dem Physikum wechselte ich zur Justus-Liebig-Universität Gießen und legte dort nach dem Sommersemester 1973 das Staatsexamen ab.

Im Frühjahr 1974 wurde ich zur Bundeswehr einberufen und war als Truppenzahnarzt in Erding und Lagerlechfeld stationiert. Anschließend arbeitete ich als Assistent bei einem frei praktizierenden Zahnarzt.

Seit September 1977 bin ich in eigener Praxis in Feldkirchen/Westerham tätig.

Seit Februar 1975 bin ich verheiratet; im Oktober 1976 kam mein Sohn Florian auf die Welt.

